

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成18年度博士課程 進学
氏名 大塚 淳
指導教員名 田之倉 優

論文題目

ホスファチジルエタノールアミン生合成系の酵素 ECT の X 線結晶構造解析

背景と目的

ホスファチジルエタノールアミン (PE) は真核生物の生体膜を構成するグリセリン脂質の一種である。PE は単なる生体膜成分にとどまらず、GPI アンカーの材料であり、一部の膜タンパク質の活性発現に必須であり、また、真核細胞の食作用に必須であることも知られている。さらに、PE は他のリン脂質に比べて極性部が小さいため、他のリン脂質とは異なる物性を有する。真核生物における PE の生合成は、ホスファチジルセリン (PS) が脱炭酸により PE に変換される経路 (図 1 下部の右方向の矢印で示す) と、エタノールアミンから 3 段階の酵素反応で PE が合成される経路 (CDP-Etn 経路または Kennedy 経路と呼ばれる。図 1 の下方向の矢印 3 本で示す) の 2 つの経路が存在する。真核生物は、真核生物に特有な CDP-Etn 経路を主要経路として PE の生合成をおこなっている。

酵素 CTP:phosphoethanolamine cytidylyltransferase (ECT) は、CDP-Etn 経路の 2 段階目の反応を担い、この経路を制御する鍵酵素と考えられている。本研究では、ECT の触媒機構および活性制御機構を解明することを目的とし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 ECT の X 線結晶構造解析を行った。

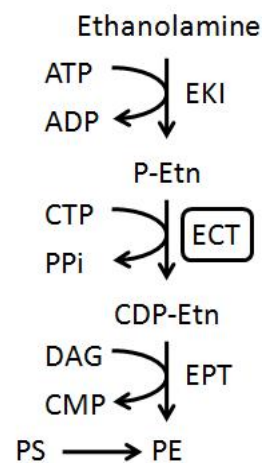


図 1 PE 生合成系

1. 基質CTPとの複合体構造

大腸菌を宿主とする発現系を用い、N末端にヒスチジンタグを付加した *S. cerevisiae* 由来 ECT (以下 ECT と表記) を大量発現させた。菌体破砕液からアフィニティー精製、ヒスチジンタグの切除、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、ECT を精製した。結晶化条件の探索の結果、基質 CTP を含む溶液条件で ECT と CTP の複合体結晶を得た。Photon Factory のビームラインを利用し、X線回折データを収集した。セレンメチオニン置換体結晶の回折データを同様に収集し、Se-単波長異常分散法 (SAD) 法によって位相と初期構造を決定した。その後、モデル構築、精密化を進め、ECT・CTP 複合体構造を分解能 2.1 Å で決定し、ECT と基質 CTP との結合様式を明らかにした。

アミノ酸配列から予想された通り ECT 分子は N 末端側と C 末端側の 2 つのシチジル基転移酵素様ドメインから構成されていたが、予想に反し N 末端側ドメインにのみ活性部位が存在することが明らかになった (図 2)。

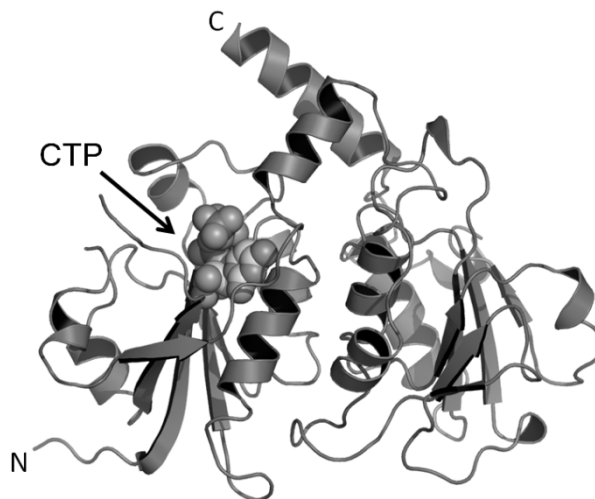


図 2 ECT の全体構造

2. 反応産物CDP-Etnとの複合体構造

上記 1 と同様に ECT を精製し、反応産物 CDP-Etn を含む溶液条件で ECT と CDP-Etn との複合体結晶を得て回折データを収集した。上記の ECT・CTP 複合体構造をモデル分子として分子置換法で位相を決定し、ECT・CDP-Etn 複合体構造を分解能 2.1 Å で決定した。反応産物 CDP-Etn の結合様式を決定し、活性部位近傍に位置するループ (酸性ループ) が基質 CTP 結合型では開構造を、反応産物 CDP-Etn 結合型では閉構造をとることを示した (図 3)。

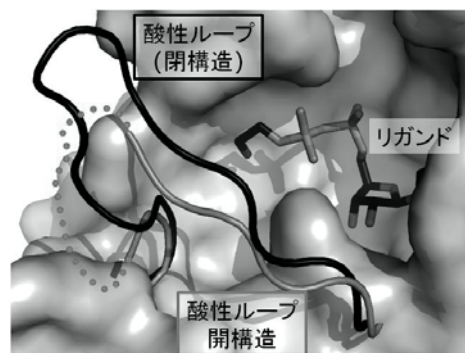


図 3 酸性ループの構造変化

3. 反応産物複合体CDP-Etn・Mg・PPiとの複合体構造

上記 1 と同様に ECT を精製し、2 つの基質 CTP と *O*-phosphoethanolamine (P-Etn) を含む溶液条件で、複合体結晶を得て回折データを収集した。ECT・CTP 複合体構造をモデル分子として分子置換法で位相を決定し、ECT・CDP-Etn・Mg・PPi 複合体構造を分解能 2.1 Å で決定した。結晶中で反応が進行し、得られた複合体構造では ECT に 2 つの反応産物 CDP-Etn と PPi が活性部位に結合していた。

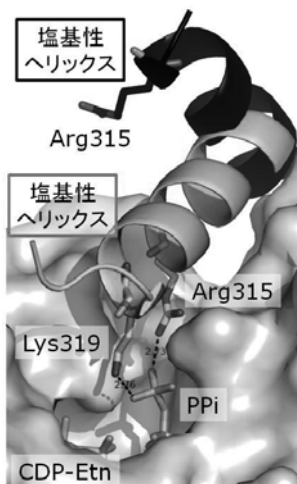


図4 塩基性ヘリックス

活性部位近傍の酸性ループは ECT・CDP-Etn 複合体構造と同様に閉構造をとっていた。他の複合体構造では ECT の C 末端に存在する α ヘリックス（塩基性ヘリックス）の電子密度が不明瞭だったが、ECT・CDP-Etn・Mg・PPi 複合体ではほぼ全領域の構造を決定できた。非対称単位中の ECT 2 分子のうち、一方の分子では塩基性ヘリックスが 1 本の長い α ヘリックスを形成し、溶媒領域へ向かって伸びていた。もう一方の ECT 分子では塩基性ヘリックスが途中で折れ曲がって N 末端側ドメインの活性部位に近接し、反応産物 PPi との相互作用が見られた。このことから塩基性ヘリックスが PPi と相互作用することにより、ECT の反応や活性制御に関与しうることが示唆された。

負電荷をもつ 2 つの反応産物 CDP-Etn と PPi の間に正電荷をもつ Mg イオンが位置して、活性部位に収まっていた（図 5）。Mg イオンは CDP-Etn と PPi の静電的な反発を中和していたが、ECT とはまったく相互作用してなかった。

本複合体構造は、ECT の ordered bi bi 反応（図 6）において、2 種類の反応産物が結合した反応中間状態の構造に相当する（図 6 の stage 4）。ヌクレオチジル転移酵素ファミリーに属する酵素で、この反応中間状態の結晶構造はまだ報告されておらず、本構造が最初の例である。

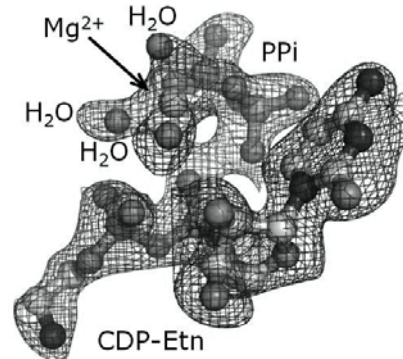


図5 反応産物複合体

4. Ordered bi bi 反応

過去の酵素学的研究において、ラット由来 ECT の反応機構が ordered bi bi 反応であると提唱されている。提唱されたモデルによると、基質 CTP が第一基質として結合し、さらに P-Etn が第二基質として活性部位へ結合し、シチジル基の転移反応が起こる。そして、活性部位に生成された 2 つの反応産物 CDP-Etn と PPi のうち、PPi が先に ECT から解離し、最後に CDP-Etn が ECT から解離する。

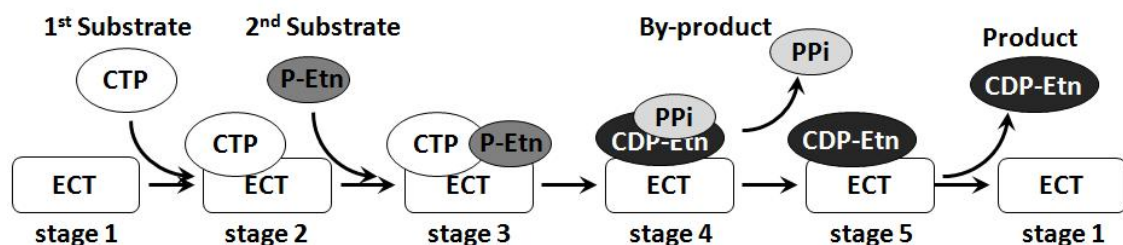


図6 ECT の ordered bi bi 反応

3 種類の複合体の結晶構造中に見られたリガンド結合様式から、酵母 ECT もラット ECT と同じ ordered bi bi 反応機構により反応を触媒することが示された。上記 1、2、3 の複合体構

造は、ordered bi bi 反応の 5 つの段階のうちの 3 つの段階に対応すると考えられる (図 6 において ECT・CTP 複合体は stage 2、ECT・CDP-Etn・Mg・PPi 複合体は stage 4、ECT・CDP-Etn 複合体は stage 5 に対応する)。酵母 ECT の反応機構を ordered bi bi と判断した根拠は次の通りである。基質 CTP は活性部位の奥深くに結合しており、もう 1 つの基質 P-Etn が CTP より先に ECT に結合すると立体障害により CTP の結合を阻害するため、基質の結合順序は CTP が先、P-Etn が後となる。また、2 つの反応産物 CDP-Etn と PPi の配置から、反応産物の解離の順序は PPi が先、CDP-Etn が後であることが示された。以上、3 種類の複合体構造から、ECT の基質認識機構、反応中間状態、反応産物認識機構の詳細が明らかになり、反応が進行する様子を可視化できた。

5. ECTの構造変化

複数のリガンド結合状態における ECT の結晶構造中に、2 つの興味深い構造変化が観察された。(1) ECT の活性部位近傍に位置する酸性ループは、反応の進行にともなって開構造から閉構造に変わることが示された。閉構造においては活性部位の出入り口が閉じられていたことで反応産物 CDP-Etn の解離が妨げられていた。この現象は可溶性酵素 ECT から内膜系に存在する膜酵素 EPT(図 1)に CDP-Etn を効率よく受け渡すための仕組みの一部であると推測している。

(2) C 末端に存在する塩基性ヘリックスは、ECT・CTP 複合体および ECT・CDP-Etn・Mg・PPi 複合体構造中で、2 種類のコンホメーション (真っ直ぐな形状と約 73° 折れ曲がった形状) を有していた。このことから、塩基性ヘリックスはリガンドの結合状態によらずヒンジ運動ないしスイング運動を行っていること示唆された。塩基性ヘリックス上の Arg315 と Lys319 が反応産物の PPi と相互作用していたことから、塩基性ヘリックスが反応産物 PPi の活性部位からの引き抜きに寄与すると推測している。

総括

S. cerevisiae 由来 ECT の結晶構造を、CTP 結合型、CDP-Etn・Mg・PPi 結合型、CDP-Etn 結合型の 3 状態で決定した。その結果、ECT の活性部位が N 末端側ドメインにのみ存在することが明らかになった。3 種類の複合体構造から、ECT の基質認識機構、反応中間状態、反応産物認識機構の詳細が明らかになり、酵母由来 ECT もラット酵素と同じく ordered bi bi 反応機構を有することを示し、反応が進行する様子を可視化できた。また、触媒部位近傍の酸性ループが反応の進行とともに開構造から閉構造に変化し CDP-Etn の解離を妨げることが示唆された。これは反応産物 CDP-Etn を次段階の膜酵素 EPT に効率よく受け渡すための仕組みの一部であると考えられる。一方、C 末端の塩基性ヘリックスは反応産物 PPi の引き抜きに関与すると結晶構造から示唆され、変異体の活性測定からもこのことが支持された。